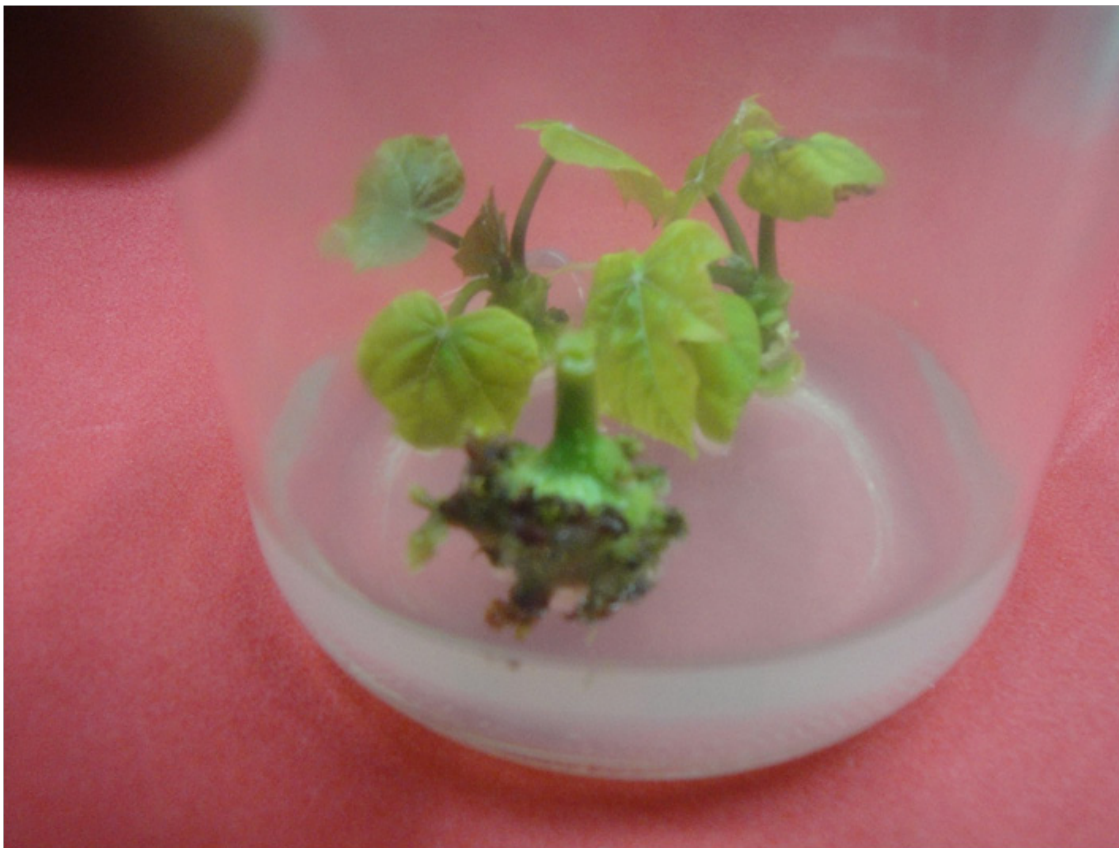


Multiplicação *In Vitro* de Pinhão-Manso





ISSN 0103-0205

Novembro, 2014

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 250

Multiplicação *In Vitro* de Pinhão-Manso

*Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Ákyla Maria Martins Alves
Nair Helena Castro Arriel
Amanda Micheline Amador de Lucena
José Wellington dos Santos
Taiza da Cunha Soares*

Campina Grande, PB
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário

CEP 58428-095

Caixa Postal 174

Fone: (83) 3182 4300

Fax: (83) 3182 4367

Home page: <http://www.cnpa.embrapa.br>

E-mail: cnpa.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Valdinei Sofiatti

Secretário-Executivo: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Membros: Dartanhã José Soares, Everaldo Paulo de Medeiros, Francisco José Correia Farias, João Henrique Zonta, José Ednilson Miranda, Máira Milani, Nair Helena Castro Arriel e Thaise Dantas de Almeida Xavier

Supervisão editorial: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Revisão de texto: Everaldo Correia da Silva Filho

Normalização bibliográfica: Elizabete Alves de Almeida Soares

Editoração eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Foto da capa: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

1ª edição

1ª impressão (2014): On line

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Algodão

Multiplicação *in vitro* de pinhão-manso / editores técnicos, Julita Maria Frota Chagas Carvalho... [et al.]. – Campina Grande : Embrapa Algodão, 2014.
19 p. - (Documentos / Embrapa Algodão, ISSN 0103-0205 ; 250).

Editores técnicos: Julita Maria Frota Chagas Carvalho, Ákyla Maria Martins Alves, Nair Helena Castro Arriel, Amanda Micheline Amador de Lucena, José Wellington dos Santos, Taiza da Cunha Soares.

1. Pinhão-manso. 2. Planta matriz. 3. Multiplicação dos brotos. 4. Multiplicação *in vitro* de pinhão-manso. I. Carvalho, Julita Maria Frota Chagas, ed. II. Embrapa Algodão. III. Série.

CDD: 633.85

© Embrapa 2014

Autores

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Engenheira-agrônoma, Ph.D. em Recursos Fitogenéticos,
pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB
julita.carvalho@embrapa.br

Ákyla Maria Martins Alves

Bióloga, estagiária Embrapa Algodão
akyllamartins@hotmail.com

Nair Helena Castro Arriel

Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Melhoramento Genéticos,
pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB,
nair.arriel@embrapa.br

Amanda Micheline Amador de Lucena

Bióloga, D.Sc. em Recursos Naturais
amandamicheline@hotmail.com

José Wellington dos Santos

Engenheiro-agrônomo, M.Sc. em estatística,
pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB,
jose-wellington.santos@embrapa.br

Taiza da Cunha Soares

Bióloga, M.Sc, em Ciências Agrárias
taizabiologa@gmail.com

Apresentação

É reconhecido por todos que a biotecnologia é de extrema importância para o futuro da agricultura, permitindo avanços tecnológicos sem precedentes. Uma das ferramentas da biotecnologia é, sem dúvida, a micropropagação, já que, a partir da cultura de tecidos *in vitro*, é possível a obtenção de plantas geneticamente idênticas às do exemplar original, em um número elevado e num breve espaço de tempo. As técnicas de cultura *in vitro* apresentam um papel importante para a conservação do germoplasma e a fixação de ganhos genéticos. Dessa forma, um dos maiores benefícios das técnicas de cultura de tecidos vegetais para o melhoramento de plantas perenes refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética por meio da propagação clonal, além de ser uma ferramenta importante na obtenção de plantas transgênicas.

Valdinei Sofiatti

Chefe-adjunto de Transferência de Tecnologia

Sumário

Multiplicação <i>in vitro</i> de pinhão-manso.....	9
Introdução.....	9
Considerações gerais.....	10
Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	10
Cultivo de tecidos.....	11
Metodologia.....	12
Obtenção de planta matriz.....	12
Multiplicação dos brotos	13
Alongamento das brotações.....	13
Avaliação dos ensaios.....	13
Resultados e Discussões.....	14
Conclusões.....	17
Referências.....	17

Multiplicação *in vitro* de Pinhão-Manso

Julita Maria Frota Chagas Carvalho

Ákyla Maria Martins Alves

Nair Helena Castro Arriel

Amanda Micheline Amador de Lucena

José Wellington dos Santos

Introdução

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae e vem sendo estudada por causa da possibilidade de seu óleo ser utilizado como matéria-prima para a produção de biocombustível (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2009) e por sua torta possuir significativos teores de nitrogênio, fósforo e potássio; potencial termoquímico com considerável poder calorífico; além de apresentar alto valor proteico (RODRIGUES, 2013).

O cultivo do pinhão-manso limita-se por fatores, como baixa produtividade e irregularidade na germinação das sementes, o que provoca um estande desuniforme, forçando, às vezes, o replantio (ALBUQUERQUE et al., 2009). Nesse contexto, o emprego de ferramentas biotecnológicas, como o cultivo *in vitro*, constitui-se em uma importante alternativa para otimizar a produção da espécie em larga escala e selecionar plantas geneticamente uniformes e sadias (FRANCO, 2013). Para isto, é necessário definir protocolos de micropropagação *in vitro* bem estabelecidos, de modo que possa auxiliar o melhoramento genético do pinhão-manso, a fim de oferecer

em médio prazo cultivares que atendam a todos os requisitos de uma cultura energética comercial.

A possibilidade de associar tecnologias, tais como a micropropagação, ao melhoramento genético clássico, além de permitir a obtenção de plantas com as características almejadas, auxilia na conservação da variabilidade genética já adquirida pelo melhoramento convencional (POUPIN; ARCE-JONHSON, 2005).

Considerações gerais

Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

O pinhão-manso pertence à família das Euforbiáceas (ARRUDA et al., 2004). É um arbusto ou árvore que ocorre desde o Maranhão até o Paraná, mesmo em áreas de solos arenosos e pouco férteis. Possui crescimento rápido e sua altura normal é de 2 m a 3 m, mas pode alcançar até 5 m em condições especiais. O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20 cm, com caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente, e o floema possui longos canais que se estendem até as raízes, nos quais circula o látex; as raízes são curtas e pouco ramificadas (ARRUDA et al., 2004).

Nos últimos anos, tem ocorrido um forte investimento em pesquisas com culturas bioenergéticas que possam substituir o combustível fóssil de maneira sustentável e eficaz. O pinhão-manso tem se mostrado promissor nesse ramo.

O principal motivo que impulsionou os estudos com pinhão-manso, nesse sentido, foi em virtude dos custos de produção serem muito favoráveis (FRANCO; GABRIEL, 2008). Além disso, a cultura é capaz de produzir em áreas com baixa precipitação e ser usada na recuperação de solos degradados. Suas propriedades são aptas para regiões áridas e semiáridas, podendo tornar-se importante fonte de renda.

Entretanto, há grandes desafios para que essa cultura torne-se viável para cultivo em larga escala e produção de óleo combustível. Nesse contexto, a incorporação da biotecnologia, aliada a programas de melhoramento, poderá auxiliar no desenvolvimento de cultivares agrônomicas e na produção comercial de mudas com alta qualidade fitossanitária em menor período de tempo (LOPES *et al.*, 2012).

Cultivo de tecidos

De acordo com Almeida (2007), a Cultura de Tecidos ou o cultivo *in vitro* visa à obtenção de uma nova planta a partir de fragmentos de tecido, operação que também é chamada de clonagem. O princípio básico deste processo é o isolamento de qualquer parte da planta, a qual é chamada explante, podendo ser desde uma célula individual até órgãos como anteras, gemas axilares e ou apicais, fragmentos de hipocótilo, caule, folhas, raízes, órgãos de armazenamento e até segmentos de frutos. O explante é cultivado sobre um substrato gelatinoso contendo nutrientes, denominado meio de cultura.

As técnicas de cultura *in vitro* apresentam um papel importante para a conservação do germoplasma, fixação de ganhos genéticos e indução da variação genética. Dessa forma, um dos maiores benefícios das técnicas de cultura de tecidos vegetais para o melhoramento de plantas perenes refere-se à possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética por meio da propagação clonal (TAMBARUSSI, 2009).

Atualmente diversos trabalhos estão sendo realizados visando ao melhoramento vegetal de diversas espécies de importância econômica real ou potencial, como o pinhão-manso.

A organogênese *in vitro* envolve vias complexas, com atuação de múltiplos fatores externos e internos, como a fonte de explante, o meio de cultura e os fatores do ambiente (D'ONOFRIO; MORINI, 2006). O processo de organogênese depende, também, da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (GEORGE *et al.*, 2007).

Metodologia

Obtenção de planta matriz

As sementes de pinhão-mansó utilizadas para produção das plantas matrizes foram provenientes de acessos pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de pinhão-mansó da Embrapa Algodão, em que está situado sob as coordenadas 7°00'02"S 37°18'43"W, no Município de Patos, PB.

As sementes foram coletadas de plantas de pinhão-mansó com 65 meses. Após a coleta, as sementes foram encaminhadas ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Algodão, onde foram adotados os procedimentos para a obtenção de plantas matrizes.

Inicialmente foi retirado o tegumento das sementes e, posteriormente, desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% (v/v) de cloro ativo e duas gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução (CARVALHO, 2000). Para retirar o excesso da solução, as sementes foram mergulhadas três vezes em água destilada esterilizada e permaneceram imersas durante 24 horas para facilitar a retirada do embrião. Os procedimentos para obtenção das plantas matrizes ocorreram na câmara de fluxo laminar e com o auxílio de instrumentos cirúrgicos.

Foram excisados das sementes os eixos embrionários e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem regulador de crescimento, acrescido com 3% (m/v) de sacarose e 0,55% (m/v) de ágar e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (Figura 1a). As culturas foram mantidas no escuro, até iniciar a germinação e, posteriormente, sob condições de luminosidade com irradiância de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura 25 ± 2 °C por 25 dias.

Após o desenvolvimento das plantas matrizes, foram excisados os explantes a partir de nós cotiledonares, os quais foram inoculados para o estabelecimento das plântulas (Figura 1b).

Multiplicação dos brotos

Na multiplicação dos brotos de pinhão-manso, foi utilizado meio MS suplementados com thidiazuron (TDZ) (Figura 1c) nos seguintes tratamentos: T1: 0,0 mg/L (controle); T2: 0,0025 mg/L; T3: 0,0050 mg/L; T4: 0,0250 mg/L; T5: 0,500 mg/L; T6: 0,1000 mg/L; T7: 0,5000 mg/L; T8: 1,0000 mg/L, acrescido com 3% de glicose e 0,6% de gelrite, pH ajustado para 5,8.

Empregou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado com oito tratamentos e dez repetições, em que cada unidade experimental consistiu em um frasco com 20 mL de meio e três explantes.

Fotos: Julita Maria Frota Chagas Carvalho

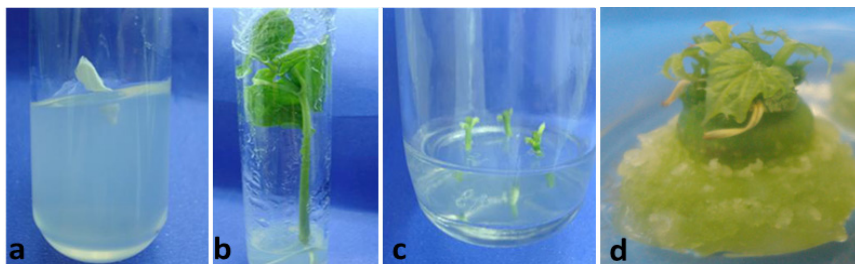


Figura 1. Planta matriz, estabelecimento do explante e multiplicação de brotos em pinhão-manso. (a) Eixo embrionário da semente inoculado *in vitro*; (b) Planta matriz cultivada *in vitro*; (c) Explantes nós cotiledonares estabelecidos em meio MS + TDZ; (d) Brotos após 15 dias de cultivo.

Alongamento das brotações

Após a proliferação dos brotos, estes foram transferidos para meio de cultivo sem reguladores de crescimento ou com baixas concentrações de thidiazuron.

Avaliação dos ensaios

As avaliações foram realizadas a cada 15 dias, analisando-se os seguintes parâmetros: número de brotos/explante, número de folhas e tamanho do broto. Considerou-se superbrotamento os explantes que apresentaram mais de dois brotos.

Resultados e Discussões

Verifica-se na Tabela 1 que a concentração que apresentou maior média do número de brotos foi quando se utilizou 0,1 mg/L de TDZ a partir de nós cotiledonares de pinhão-manso. Entretanto, as concentrações 0,025, 0,05 mg/L e 1,0 mg/L de TDZ mostraram-se promissoras.

Tabela 1. Média do número de brotos nos diferentes tratamentos.

Citocinina	Concentrações (mg/L)							
	T1 0,0	T2 0,0025	T3 0,005	T4 0,025	T5 0,05	T6 0,1	T7 0,5	T8 1,0
TDZ	0,0	1,17	1,0	2,33	2,17	2,67	1,1	2,4

Observou-se que, ao se utilizar concentrações mais elevadas, a citocinina utilizada proporcionou maior quantidade de brotos por explante (Figura 2a). Entretanto, ocorreu um grande número de plantas vitrificadas e calogênese, que podem comprometer o desenvolvimento dos brotos, tornando-os inviáveis (Figura 2b).

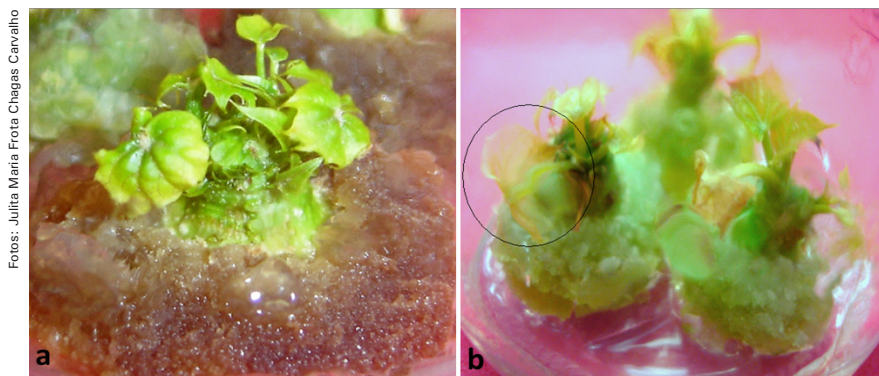


Figura 2. (a) Vitrificação e; (b) Calogênese em brotos de pinhão-manso provenientes de meio de cultura suplementado com elevadas concentrações de TDZ.

A presença de calogênese e a quantidade de brotos gerados foram expressivas em maiores concentrações de TDZ (Figura 3a). Na calogênese ocorre desdiferenciação celular, que é a perda da especialização e reversão da célula a um estado meristemático. Os calos são ideais para propagação a partir da embriogênese somática,

em sistema automatizado e em larga escala, pois quando são subdivididos podem produzir milhares de propágulos (BARBOZA *et al.*, 2007). As baixas concentrações de TDZ não apresentaram expressiva calogênese, e a formação de brotos foi baixa. Pode-se observar na Figura 3b que, para ocorrer a indução de brotos em pinhão-manso, necessita-se da suplementação de fito-hormônio ao meio de cultura.

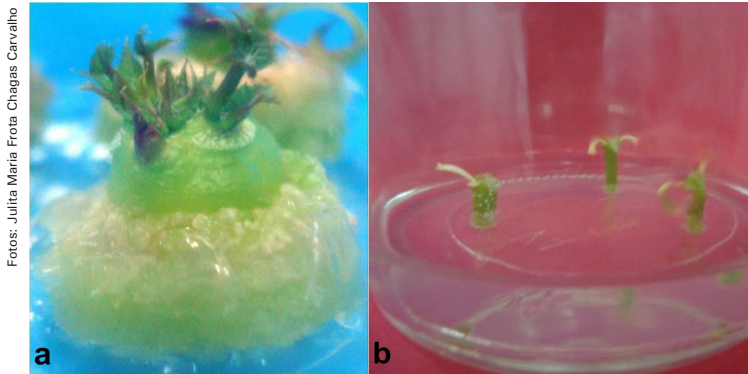


Figura 3. (a) Brots originados de meio suplementado com 0,1 mg/L de TDZ; (b) Brots em meio MS sem regulador de crescimento.

Os brotos alongados e enraizados foram aclimatizados, processo necessário em plantas obtidas *in vitro*, isso porque a transferência direta para as condições de campo acarreta, em geral, a morte quase que total de todas elas. Assim, é necessária uma fase intermediária entre o laboratório e a área de cultivo. Esta fase é realizada em casa-de-vegetação, com sistema de nebulização intermitente e sombreamento (Figura 4).

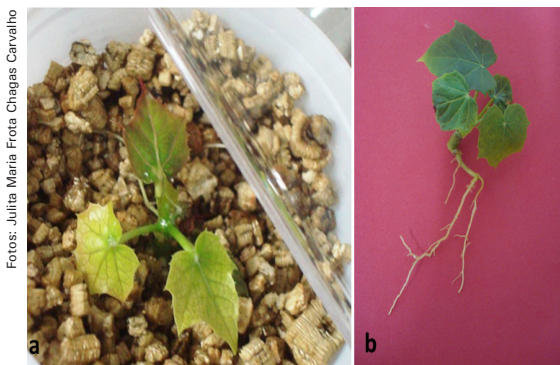


Figura 4. Plântula de pinhão-manso aclimatizada em substrato estéril (vermiculita).

O substrato para aclimatização das plantas deve reunir características físicas e químicas, como maior teor de matéria orgânica que promovam, respectivamente, a retenção de umidade e disponibilidade de nutrientes, de modo que atendam às necessidades da planta (CUNHA et al., 2006).

Em geral, o processo de aclimação segue as seguintes etapas:

- a) Retirada da muda enraizada *in vitro*.
- b) Lavagem do sistema radicular para retirar o excesso de meio de cultura, o qual pode prejudicar o desenvolvimento durante a aclimatização.
- c) Transferência da muda para substrato preferencialmente estéril, umedecido e mantido em casa-de-vegetação com nebulização intermitente e temperatura controlada, de modo que a umidade relativa do ar seja próxima a 100%. As mudas deverão ser mantidas sob sombreamento intenso, para reduzir o estresse.
- d) Aplicação de meio de cultura líquido durante os primeiros dias de aclimatização, como uma adubação foliar.
- e) Manutenção no ambiente de aclimatização pelo tempo suficiente para se ter certeza de que as mudas sobreviveram.
- f) Redução gradual da umidade relativa do ar, do teor de água do substrato e do sombreamento.
- g) Transferência para o viveiro ou área de cultivo.

Por isso, durante as primeiras semanas de aclimação, deve-se evitar excessiva perda de água por transpiração, colocando-se sobre cada plântula um frasco de vidro invertido ou cultivando-a, dentro de casa-de-vegetação, túnel de plástico ou em casa-de-vegetação com sistema de neblina. A temperatura e a irradiação luminosa devem ser reduzidas para evitar excesso de transpiração.

Conclusões

- O thiadiazuron induz o superbrotamento de pinhão-manso.
- Concentrações elevadas de TDZ proporcionam vitrificação e calogênese.
- Concentrações menores de TDZ induzem poucas brotações e calos.
- A calogênese e vitrificação interferem no desenvolvimento dos brotos.

Referências

ALBUQUERQUE, F. A.; CASTRO, N. H. C.; BELTRÃO, N. E. M., LUCENA, A. M. A.; SOUZA, S. L.; FREIRE, M. A. O.; SAMPAIO, L. G. Análise de crescimento inicial do *Jatropha curcas* em condições de sequeiro, **Rev. Bras. Ol. Fibros.**, v.13, n.3, p.99-106, 2009.

ALMEIDA, J. A. S. Da folha à obtenção de embriões somáticos de Coffea. **O Agrônômico**, Campinas, v. 59, n. 1, 2007.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. de M.; ANDRADE, A. P. de; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Rev. Bras. Ol. Fibros.**, Campina Grande, v.8, n.1, p.789-799, 2004.

BARBOZA, S. B. S. C.; SANTOS, M. C.; SOUSA, J. A. de; LÉDO, A. da S. Indução de calogênese *in vitro* em explantes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso de Cultura de Tecidos de Plantas, 3., 2007, Goiânia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 960-960, 2007.

BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. de. **Direcionamento dos resíduos e coprodutos da fabricação do biodiesel a partir de mamona e pinhão manso**. Bahia Análise & Dados, v. 18, n. 4, p. 613-619, 2009.

CARVALHO, J. M. F. C.; MORAES, A. M. de; ANDRADE, W. F. de; NÓBREGA, M. B. de M.; SANTOS, J. W. dos. **Melhoria da germinação das sementes de mamoneira (*Ricinus comunis* L.) *in vitro*, através da quebra de dormência e desinfestação.** Campina Grande: Embrapa-CNPA, 2000. 7p. (Embrapa-CNPA. Comunicado Técnico, 125).

CUNHA, M. P. S. C.; PONTES, C. L. F.; CRUZ, I. A.; CABRAL, M. T. F. D.; CUNANETO, Z. B.; BARBOSA, A. P. R. Estudo químico de 55 espécies lenhosas para geração de energia em caldeiras. In: ENCONTRO BRASILEIRO EM MADEIRAS E EM ESTRUTURAS DE MADEIRAS, p. 3, 1989.

D'ONOFRIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 07, p.194-199, 2006.

FRANCO, D. A. S.; GABRIEL, D. Aspectos fitossanitários na cultura do Pinhão manso (*Jatropha curcas* L) para a produção de biodiesel. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 63-64, 2008.

FRANCO, M. C. **Micropropagação e transformação genética de pinhão-manso (*J. curcas* L.).** 2013. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônômico, Campinas-SP, 2013.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant Propagation by Tissue Culture.** Springer, 2007. 709 p.

LOPES, L. C.; MACHADO, I. S.; MAGOGA, E. C.; ANDRADE, J. G. de; PENNA, H. C.; MORAES, L. E. F. Cultura de embrião e indução de brotos *in vitro* para micropropagação do pinhão manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 7, p. 900-905, jul. 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

POUPIN, M. J.; ARCE-JONHSON, P. Transgenic trees for a new era. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, n. 41, p. 91-101, 2005.

RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, C. M.; ABDELNUR, P. V.; ABDELNUR, P. V. **Destoxificação e aproveitamento das tortas de pinhão-manso e mamona: perspectivas em pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2013. 322p.(Embrapa Energia. Documentos,16).

TAMBARUSSI, E. V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera***. 2009. 122p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2009.



Algodão

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

